

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620101152315

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

P-TEFb 重活化的调控机制

The Regulatory Mechanism of P-TEFb's Reactivation

刘江舫

指导教师姓名: 陈瑞川 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学专业

论文提交日期: 2013 年 06 月

论文答辩时间: 2013 年 07 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 07 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

英文缩略语对照表	I
摘 要.....	III
Abstract.....	IV
1. 前言.....	1
1.1 真核基因转录的延伸机理	1
1.1.1 真核基因转录循环.....	1
1.1.2 RNA Pol II 及其 CTD 结构	3
1.1.3 RNA Pol II CTD 的磷酸化循环	3
1.2 P-TEFb 复合体简介.....	4
1.2.1 P-TEFb 的发现及其结构.....	4
1.2.2 P-TEFb 的生物学功能.....	5
1.2.2.1 P-TEFb 的生理功能.....	5
1.2.2.2 P-TEFb 在转录延伸和 RNA 剪辑过程中的功能	5
1.2.2.3 P-TEFb 在 HIV-1 转录中的功能.....	7
1.2.2.4 P-TEFb 与肿瘤发生的关系.....	7
1.2.2.5 P-TEFb 与心肌肥大的关系.....	8
1.3 P-TEFb 的活性调控机制.....	9
1.3.1 7sk snRNP 复合体中的 P-TEFb 无转录活性	9
1.3.2 与 BRD4 结合的 P-TEFb 有通用转录活性.....	9
1.3.3 P-TEFb 两种形态间的转换平衡及其信号调控机制.....	10
1.4 本课题研究的目标、内容和意义	13
2. 实验材料与方法	14
2.1 实验药品、试剂与仪器	14
2.1.1 细胞株、菌株和质粒资源.....	14
2.1.2 主要试剂和材料.....	14
2.1.3 主要实验仪器和耗材.....	16

2.2 常用溶液配方	17
2.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒转化相关溶液.....	17
2.2.2 质粒 DNA 制备相关溶液.....	17
2.2.3 质粒 DNA 亚克隆相关操作	18
2.2.4 细胞培养、转染及感染相关溶液.....	18
2.2.5 生化实验相关溶液.....	19
2.2.6 Western Blot 相关溶液.....	19
2.3 实验方法	20
2.3.1 大肠杆菌感受态细胞的制备.....	20
2.3.2 质粒转化.....	20
2.3.3 质粒 DNA 的制备	21
2.3.3.1 质粒 DNA 小量提取.....	21
2.3.3.2 质粒大量提取(QIAGEN 试剂盒).....	21
2.3.4 DNA 限制性内切酶酶切.....	22
2.3.5 DNA 样品琼脂糖凝胶电泳.....	23
2.3.6 琼脂糖凝胶回收 DNA 片段 (Sangon 试剂盒)	23
2.3.7 DNA 连接.....	24
2.3.8 普通 PCR 反应.....	24
2.3.9 突变 PCR 反应 (改进型 QuikChange 方案)	25
2.3.10 细胞培养.....	26
2.3.11 细胞瞬时转染.....	27
2.3.12 慢病毒包装感染.....	27
2.3.13 细胞的药物处理.....	27
2.3.14 全细胞裂解液.....	28
2.3.15 高盐/低盐组分抽提 (Nuclear Fractionation)	28
2.3.16 免疫共沉淀.....	28
2.3.17 SDS-PAGE 蛋白电泳.....	29
2.3.18 免疫印记实验 (Western Blot)	29
2.3.19 Depletion.....	30

2.3.20 PP1 α 、PP2B 体外实验	30
2.3.21 BRD4 体外诱导 T186 磷酸化实验	30
3.结果与讨论	32
3.1 改进的核分级抽提方法	32
3.2 信号刺激导致 P-TEFb 复合体解离.....	33
3.3 多种细胞处理条件诱导 P-TEFb 复合体的解离	36
3.4 CDK9 T186 位点去磷酸化是信号诱导 P-TEFb 复合体解离的前提	37
3.5 BRD4 结合的 P-TEFb 中 CDK9 T186 处于磷酸化状态.....	38
3.6 BRD4 与 P-TEFb 相互作用是诱导 CDK9 自磷酸化的关键	40
3.7 结论.....	42
3.8 讨论.....	42
参考文献	45
致谢.....	52
附录 图表索引	53

Contents

Abbreviation.....	I
Abstract in Chinese.....	III
Abstract in English	IV
Chapter 1. Forewords.....	1
1.1 Eukaryotic gene transcription elongation	1
1.1.1 Eukaryotic gene transcription cycle.....	1
1.1.2 RNA Pol II and CTD structure.....	3
1.1.3 Phosphorylation cycle of the Pol II CTD.....	3
1.2 Introduction of P-TEFb complex	4
1.2.1 Discovery of P-TEFb and its structure.....	4
1.2.2 Function of P-TEFb	5
1.2.2.1 Biological function of P-TEFb.....	5
1.2.2.2 P-TEFb is a general transcriptional elongation factor and affects pre-mRNA splicing	5
1.2.2.3 Fuction in HIV-1transcription.....	7
1.2.2.4 P-TEFb and tumorigenesis.....	7
1.2.2.5 P-TEFb and pathological cardiac hypertrophy.....	8
1.3 The regulation mechanism of P-TEFb transcription activity.....	9
1.3.1 P-TEFb loses its transcriptionally active when sequestered into 7sk snRNP complex.....	9
1.3.2 P-TEFb that binds with BRD4 is transcriptionally active.....	9
1.3.3 The regulation mechanism of dynamic exchanges between active and inactive P-TEFb complex	10
1.4 The objectives, contents and significance of research.....	13
Chapter 2 Materials and methods.....	14
2.1 Reagents and instruments	14

2.1.1 Cell lines, <i>E.coli</i> and plasmids	14
2.1.2 Reagents and materials	14
2.1.3 Instruments and expendable supplies.....	16
2.2 Instruments and solutions	17
2.2.1 The solutions for preparation of competent <i>E.coli</i> cells	17
2.2.2 The solutions for preparation of DNA	17
2.2.3 The solutions for subclone	18
2.2.4 The solutions for cell culture, transfection and infection.....	18
2.2.5 The solutions for biochemistry experiment	19
2.2.6 The solutions for Western Blot	19
2.3 Methods	20
2.3.1 Preparation of competent <i>E.coli</i> cells	20
2.3.2 Plasmids transformation.....	20
2.3.3 Plasmid DNA extraction and purification.....	21
2.3.3.1 Small-scale plasmid DNA extraction.....	21
2.3.3.2 Large-scale plasmid DNA extraction and purification (by QIAGEN Plasmid Maxi Kit).....	21
2.3.4 DNA Restriction endonuclease digestion of DNA	22
2.3.5 Agarose gel electrophoresis DNA sample.....	23
2.3.6 DNA Extraction from Agarose Gel.....	23
2.3.7 DNA ligation.....	24
2.3.8 Polymerase chain reaction	24
2.3.9 PCR mutagenesis (by modified QuikChange Site-Directed Mutagenesis)	25
2.3.10 Cell culture.....	26
2.3.11 Transient transfection of HeLa cell	27
2.3.12 Lenti-Virus transfection of 293T and infection of HeLa cell.....	27
2.3.13 Drug treatments of cells	27
2.3.14 Whole cells lysate	28

2.3.15 Modified nuclear fractionation	28
2.3.16 Co-immunoprecipitation purification	28
2.3.17 SDS-PAGE.....	29
2.3.18 Western Blot.....	29
2.3.19 Depletion.....	30
2.3.20 PP1 α 、 PP2B in vitro treatment	30
2.3.21 BRD4 induce T186 phosphorylation in vitro treatment	30
Chapter 3 Results and Discussion	32
3.1 Modified nuclear fractionation method	32
3.2 Signal stimulus trigger the dissociation of P-TEFb complex	33
3.3 Several inductions on F1C2 cells could trigger the dissociation of P-TEFb complex	36
3.4 Dephosphorylation of CDK9 at T186 site is the key to signal-induced dissociation of P-TEFb complex	37
3.5 T186 is rephosphorylated when P-TEFb is combined with BRD4	38
3.6 The interactions between BRD4 and P-TEFb is important for the self-phosphorylation of T186	40
3.7 Conclusion.....	42
3.8 Discussion.....	42
Reference.....	45
Acknowledgement.....	52
Appendix Index of figures and tables	53

英文缩略语对照表

Abbreviation	Full Name
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein particle, Hexim1/7SK/ P-TEFb
Act D	Actinomycin D
ATP	Adenosine-triphosphate
BD (I, II)	Bromodomain (I, II)
BRD4	Bromodomain-containing protein 4
CAK	CDK-activating kinase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CE	Cytoplasmic extraction
CF	Cytoplasmic fraction
CTD	C-terminal domain
DFO	Desferrioxamine
DOX	Doxorubicin
DRB	5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-benzimidazole
DSIF	DRB-sensitivity inducing factor
FP	Flavopirido
GTFs	General transcriptional factors
HDAC	Histone deacetylase
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
HSF	High salt fraction
LSF	Low salt fraction
MePCE	Methylphosphate Capping Enzyme
MONF	Modified nuclear fractionation
NE	Nuclear extraction
NELF	Negative elongation factor

NF	Nuclear fraction
NTEF	Negative transcription elongation factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Packed cell volume
PH	Pleckstrin-homology
PIC	Preinitiation complex
PID	P-TEFb interaction domain
Pol II	RNA polymerase II
PP1 α	Protein phosphatase 1 α
PP2B	Protein phosphatase 2B
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
StauA	StaurespholineA
TAR	Transacting-response
TEC	Transcript elongation complex
TF II (D,B,E, F, H)	Transcription factor II (D,B,E, F, H)
UV	Ultraviolet

摘 要

正性转录延伸因子 b 复合体 (positive transcription elongation factor b, P-TEFb 复合体) 是协调转录延伸步骤最重要的因子之一。P-TEFb 由 CDK9 及其调节蛋白 CycT1 组成, 具有激酶活性。细胞内存在两种形式, 有活性形式以及束缚在 7sk snRNP 复合体中的无活性形式, 两者可相互转化达到平衡。本实验室的前期研究揭示了 P-TEFb 的活性调控机制, 胞外刺激因子通过细胞内钙离子/PP2B 及 PP1 α 两条主要信号途径, 协同作用使 P-TEFb 从 7sk snRNP 中解离。首先 PP2B 的去磷酸化作用将 T186 位点暴露出来, PP1 α 对该位点进行去磷酸化, 从而使 7sk snRNP 复合体解离。同时, 胞外刺激因子激活 PP1 α 和 HDAC1/2/3 两条主要信号途径协同作用, 导致 BRD4 从染色质上解离。其中 PP1 α 对 H3S10 去磷酸化, 形成的组蛋白 Cross-talk 有利于 HDAC1/2/3 对 H4K5/K8 去乙酰化, 促使 BRD4 从染色质上解离下来。解离下来的 BRD4 将游离的 P-TEFb 募集到启动子区发挥作用磷酸化 RNA Pol II CTD 的 Ser2, 并且解除负性延伸因子的抑制作用, 转录重新启动直至合成全长 mRNA。

P-TEFb 活性的异常调控与心肌肥大和癌症等疾病有直接或间接的关联, 因此完整揭示 P-TEFb 活性调控分子模式对于了解上述疾病病理机制有重要意义。T186 位点的去磷酸化是 P-TEFb 从 7sk snRNP 解离出来的关键, 而去磷酸化的 P-TEFb 无激酶活性, 那么它如何被重新活化发挥作用这一过程显得非常重要, 本文将探讨的就是 P-TEFb 的重活化问题。本研究以 Hela 细胞株以及稳定表达 flag-CDK9 的 F1C2 细胞株为研究模型, 采用紫外线 UV、诱导分化剂 HMBA 等药物处理, 通过改进的核分级抽提技术、免疫共沉淀、Western Blot、Depletion、体外处理等一系列实验方法, 目的是揭示 P-TEFb 的重活化机理。我们的研究结果表明, 应激条件下, P-TEFb 从 7sk snRNP 复合体中解离时, P-TEFb 本身也发生解离, 前提条件是 CDK9 T186 位点的去磷酸化。BRD4 募集的 P-TEFb T186 已经恢复磷酸化状态, 重新磷酸化是一个 CDK9 自磷酸化的过程, 这个过程离不开 BRD4 与 P-TEFb 的相互作用, 这些结果初步揭示了 P-TEFb 的重活化机制。

关键词: P-TEFb 解离; P-TEFb 重活化; T186 重新磷酸化

Abstract

The positive transcription elongation factor b (P-TEFb) is an important factor that controls transcription elongation. P-TEFb is a kinase consisting of CDK9 and its regulatory subunit Cyclin T1/T2. There are two forms of P-TEFb in cells, some is active while most of P-TEFb is sequestered in a large inactive 7sk snRNP complex. Our previous studies established that P-TEFb is activated by a two-step mechanism. External stimulation activates PP2B to dephosphorylate and induce a conformational change of 7sk snRNP complex, which leads to the exposure of the phosphorylated T186. The dephosphorylation of T196p by PP1 α leads to the dissociation P-TEFb from 7sk snRNP. Meanwhile, PP1 α and HDAC1/2/3 signaling pathways are activated, and the crosstalk of the dephosphorylation of H3S10ph by PP1 α , and the subsequent deacetylation of H4K5ac/K8ac by HDAC1/2/3 finally leads to the release of BRD4 from chromatin. Thereafter, BRD4 recruits P-TEFb to the promoter region, where it phosphorylates the C-terminal domain of Pol II at Ser2, to convert it into a productive mode to synthesize full-length mRNA.

Abnormal regulation of P-TEFb activity is associated with cardiac hypertrophy and cancer and other diseases. Hence, the study of the mechanism for P-TEFb's activation is essential for understanding the etiology of these diseases. Here, we used the HeLa cells and F1C2 cells which stably expresses flag-CDK9 as model system, and use ultraviolet, HMBA to study the reactivation of P-TEFb by assays such as Modified nuclear fractionation method, Immunoprecipitation, Western Blot, depletion etc. Our research indicates that under stress conditions, P-TEFb dissociates from 7sk snRNP complex, and the two subunits of P-TEFb dissociate simultaneously, with the dephosphorylation of T186 on CDK9 indispensable for this process. When P-TEFb is recruited by BRD4, T186 on CDK9 is rephosphorylated, which is carried out by CDK9 itself. The interaction between BRD4 and P-TEFb is essential for the rephosphorylation. At this point, we revealed preliminarily the reactivation mechanism of P-TEFb.

Key words: P-TEFb Dissociation; P-TEFb Reactivation; T186 Rephosphorylation

1. 前言

真核细胞中，编码蛋白和大多数核内小 RNA (snRNA) 基因的转录是由 RNA 聚合酶 II (RNA pol II) 执行的^[1]。从真菌到人类，基因转录遵循相似的基本步骤：转录起始前复合物组装、转录起始、转录延伸和转录结束等。早期科学家们主要致力于研究转录起始前复合体 (PIC) 的组装、转录起始以及启动子区清扫的机制，很少关注 Pol II 长时间发挥功能的延伸期。近年来，随着细胞分子机制研究的深入，人们对于细胞基因转录的认识也不再停留于转录早期起始的相关分子机制探索，而是把目光投向了延伸机制的研究，并且进一步发现延伸不只是机械的添加碱基直至合成全长 mRNA 的过程，它同样受到严格的调控，与 mRNA 加帽、剪辑和加尾等过程紧密相连^[2]，是细胞发育、生长及相关基因应激转录表达的重要平台^[3]。这些突破性进展得益于 1995 年正性转录延伸因子 b (Positive Transcription Elongation Factor b, P-TEFb) 的发现及其后续研究。

P-TEFb 复合体是调控真核基因转录延伸的核心转录因子，与艾滋病^[4]、心肌肥大^[5-7]和肿瘤^[8,9]等疾病的发病机理有密切关系，有关 P-TEFb 的生物学功能及其活性调控机制仍在不断的研究发现之中。近年来，研究人员已经逐渐揭示出 P-TEFb 复合物活性调控的分子模式，以及 P-TEFb 活化的信号途径和分子机制^[10]。在细胞内，P-TEFb 以有活性和无活性复合物两种形式存在，两种复合物之间可互相转化维持平衡。应激条件下，P-TEFb 从 7SK snRNP 复合物中解离，之后 BRD4 应激活化募集有活性的 P-TEFb 至染色体上，从而激活转录，这个过程中，P-TEFb 如何从无转录活性转变为有转录活性，将是本文进一步研究的对象。本文试图阐明 P-TEFb 重活化的调控机制，为了解 P-TEFb 活化在细胞生长中的重要作用以及采用的药物模型提供理论依据，并试图为心肌肥大和肿瘤的新药开发提供可供参考的药物靶点。

1.1 真核基因转录的延伸机理

1.1.1 真核基因转录循环

真核基因转录是一个由平行或顺次发生的，一系列紧密衔接事件所构成的循环过程（如图 1.1）。这一系列精细的过程主要分为六个阶段，分别是：起始前复

合物 PIC (pre-initiation complex) 的组装、转录起始、启动子区清扫、转录延伸、终止以及转录因子的释放^[2,11]。然后重新进入新的循环，准备新一轮的转录。

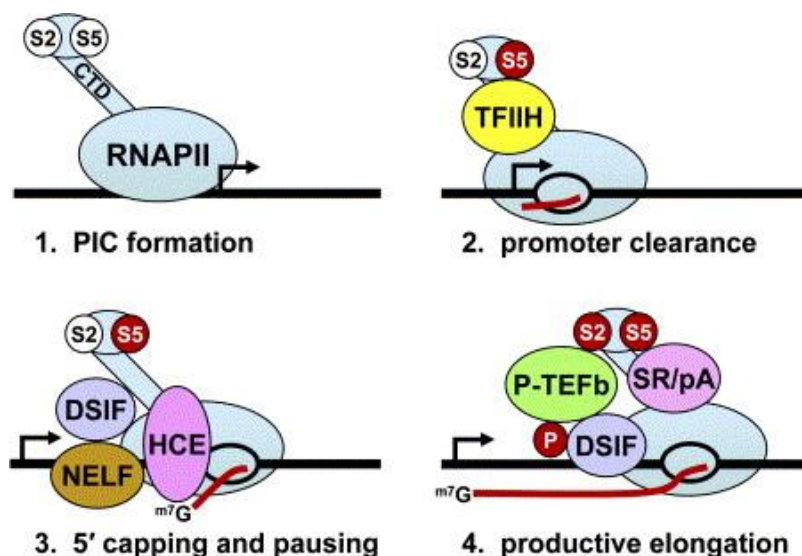


图 1.1 RNA Pol II CTD 调控的真核基因转录循环^[12]

Fig 1.1 The cycle of eukaryotic genes transcription regulated by RNA Pol II

转录起始前，核心启动区的 TATA 框最先结合通用转录因子 TFIID，之后依次募集上来的有：(1) RNA Pol II；(2) 基本转录因子 GTFs (general transcriptional factors)，包括 TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF 和 TFIID；(3) SRB (RNA 聚合酶 B 突变体抑制子)^[13-16]、SWI/SNF 染色质重构蛋白^[17] 以及 GCN5 组蛋白乙酰转移酶构成的全酶组分^[18-20]，这就是稳定的起始前复合物 PIC 的组装过程。

TFIIE 和 TFIID 具有解螺旋酶和 ATPase 活性，由 ATP 水解供能，将 DNA 螺旋的双链解开生成单链转录泡，并暴露出模板链和转录起始位点，RNA pol II 和 DNA 模板形成开放复合物，此时新合成的头两个核苷酸结合上来同时产生第一个磷酸二酯键^[21-23]，转录开始。此后，同样是由 ATP 供能，TFIID 的亚基 CDK7 将 Pol II C 末端结构域 (CTD) 第五位丝氨酸 (Ser5) 磷酸化，启动子区裸露出来^[24]，PIC 部分解体，只有 TFIID 保留到转录延伸复合物 TEC (Transcription Elongation Complex) 中，而 TFIID 等作为空间的结构骨架仍留在启动子区^[25]，帮助形成转录起始复合体，防止不完整转录的产生^[21,25-28]。

启动子清扫后，RNA 延伸到 23nt 时，形成稳定的 TEC 并处于抑制状态，转

录暂时停滞^[27, 29]。Ser5 磷酸化的 Pol II CTD 能结合加帽酶并增强其活性，为新生的 RNA 链 5'端加帽^[30-33]。加帽结束后 TEC 由抑制态转变为活化态，Pol II CTD 第二位丝氨酸（Ser2）也进一步磷酸化，转录重新启动合成全长的 mRNA^[34]。高度磷酸化的 Pol II CTD 可以结合 RNA 剪辑复合体^[35-39]，以及 3'末端切除、加 polyA 尾相关的蛋白并增强其活性^[40-43]，从而使新生的 RNA 成熟，转录终止，全长 mRNA 产物释放。因此，真核基因转录调控过程是围绕 Pol II 活性调控而进行的，并通过 Pol II 特殊结构域结合特定蛋白执行相应的功能来实现周而复始的转录。

1.1.2 RNA Pol II 及其CTD结构

RNA 聚合酶 I、II、III 是真核细胞中存在的 3 种 RNA 聚合酶。RNA 聚合酶 I 存在于细胞核仁中，负责 5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 的转录；RNA 聚合酶 II 存在于细胞核质中，负责 mRNA 和 snRNA 的合成；RNA 聚合酶 III 主要存在于细胞核质中，催化合成 tRNA、5SrRNA 以及一些稳定的小分子 RNA。

以酵母的 Pol II 结构为例，酵母的 RNA Pol II 由 12 个亚基组成，分子量 8kDa 至 200kDa 不等，功能各异。其中最大的亚基 Rpb1 主要作用是结合 DNA，参与起始位点的选择^[44]。该亚基 C 末端有一个高度保守的 CTD 结构域，由 7 个氨基酸 YSPTSPS（Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser）组成的重复多肽串联而成。这段保守序列不同种属之间重复的拷贝数不同，并且维持细胞存活其拷贝数有最低限度，酵母细胞需要至少 10 个拷贝数^[45,46]，人类细胞存活至少需要 28 个拷贝数。如果在 7 肽中插入丙氨酸可使酵母出现致死效应^[47]，由此可见 7 肽重复序列的完整性对细胞来说有至关重要的作用^[48]。

1.1.3 RNA Pol II CTD的磷酸化循环

在转录循环中，Pol II CTD 会经历一个磷酸化和去磷酸化的循环（如图 1.2）。根据 Pol II CTD 磷酸化水平的高低可将 Pol II 分为高磷酸化状态（hyperphosphorylated）和低磷酸化状态（hypophosphorylated）。在 PIC 中，Pol II 处于低磷酸化状态^[49]，作为转录因子复合物 TFII H 组分之一的 CDK7，具有激酶活性，能特异性磷酸化 Pol II CTD 上的第五位 Ser（Ser5）^[21,25,26,50]，此时启动子区暴露，转录暂停，加帽过程开始^[50,51]。完成加帽后，CDK9 特异性磷酸化 Pol II CTD 上的第二位 Ser（Ser2），重新启动转录^[12,52]，直到合成全长 RNA 并

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库